

エンドトキシンにより急性呼吸不全を呈した ラットに対するサーファクタント吸入療法

金沢大学医学部麻酔・蘇生学講座（主任：小林 勉教授）

山 田 圭 輔

エンドトキシンの経気道的注入により急性呼吸不全を呈した成熟ラット（体重 340-450g）36匹を用い、サーファクタント噴霧吸入療法を行い、吸入時間と治療効果の関係を検討した。ペントバルビタールの腹腔内投与でラットを麻酔した後、気管切開孔より挿管した。純酸素を用いて、最大吸気圧を 25cmH₂O、終末呼気陽圧を 7.5cmH₂O に設定した従圧式人工呼吸を行ったうえ、気管内チューブより肺内へ大腸菌エンドトキシン 56±24mg/kg（平均値±標準偏差）を注入した。注入後約180分で、成人呼吸窮迫症候群（adult respiratory distress syndrome, ARDS）と見なしう呼吸不全が発症した。すなわち、動脈血酸素分圧（arterial oxygen pressure, PaO₂）が 519±66mmHg から 82±22mmHg に低下し、胸部レントゲン写真で肺野にびまん性陰影が見られるようになり、4.8±2.3ml/kg の肺水腫液が気道内に出現した。また、肺コンプライアンスも低下した。この時点で、ラットを無作為に対照群、噴霧吸入30分群、60分群および120分群の4群に群分けした。対照群では、特別な治療を行わなかった結果、実験終了時（群分け後180分）に至るまで、PaO₂の平均値が 80mmHg 以下にとどまった。噴霧吸入30分群、60分群および120分群に対しては、ブタの肺から抽出したサーファクタントの分散液を超音波ネブライザーにより、それぞれ30分、60分および120分間吸入させた。その結果、噴霧吸入30分群、60分群および120分群の PaO₂は、群分け後30分目の時点で 252±120mmHg に上昇した（対照群に対し P<0.05）。しかし、噴霧吸入30分群および60分群の PaO₂は、噴霧吸入終了後より緩やかに低下し、群分け後180分目になると、対照群との間に有意差を示さなくなった。一方、噴霧吸入120分群の PaO₂は、群分け後120分目に 346±94mmHg、180分目に 391±94mmHg に達した（対照群に対し P<0.05）。胸部レントゲン写真で見られた肺野の陰影は、噴霧吸入120分群で著明に減少した。噴霧吸入60分群および120分群の肺圧量曲線は、対照群に比べ有意に良好な所見を示した（P<0.05）。また、組織学的検索でも、噴霧吸入120分群では対照群に比べ、肺胞含気量が多く、肺間質への細胞浸潤が少ないという所見を得た。なお、サーファクタントとテクネシウムの混合物を噴霧吸入させた追加実験により、サーファクタントの肺内到達量は、噴霧吸入120分群で、最大 54mg/kg に達すると見積もられた。以上より、エンドトキシンを気道内に注入した ARDS 様の呼吸不全に対し、120分間のサーファクタント噴霧吸入療法は、著明な治療効果を示すと結論された。しかし、30～60分の噴霧吸入では、十分な効果を得るためのサーファクタントの量が肺に到達しないものと考えられた。

Key words adult respiratory distress syndrome, aerosolized surfactant, endotoxin, lung edema, ultrasonic nebulizer

成人呼吸窮迫症候群（adult respiratory distress syndrome, ARDS）では、肺サーファクタントの異常が認められている^{1)~9)}。近年、エンドトキシンの気道内注入¹⁰⁾、塩素ガスの吸入¹¹⁾、肺洗浄¹²⁾などにより ARDS に類似した呼吸不全を呈した動物に対し、サーファクタントの分散液を経気道的に肺内に直接注入する治療法（以下、直接注入法）は、早期に行われた場合、その呼吸不全を著明に改善すると報告されている。また、ARDS 患者に対しても有効であったという臨床例が報告されはじめている^{13)~17)}。しかし、直接注入法は、液体を肺に急速に投与するため、一時的にせよ血液ガス所見の悪化、気道内圧の上昇、徐脈

などをもたらす危険があり¹⁸⁾¹⁹⁾、早期の ARDS 患者に対して施行しにくいという難点がある。

サーファクタントを噴霧吸入により投与できれば、急激な水分の投与が避けられるので上記のような副作用が少なく¹⁸⁾²⁰⁾、一般臨床に受け入れられやすい。しかし、噴霧吸入法による投与方法は確立されておらず、したがってその効果も不明である。今回、著者は、経気道的にエンドトキシンを注入して ARDS 様の急性呼吸不全を発症させたラットに対し、超音波ネブライザーによりサーファクタントの噴霧吸入（以下、噴霧吸入療法）を行い、呼吸不全に対する効果、特に吸入時間と効果

平成6年11月29日受付、平成7年1月23日受理

Abbreviations: ARDS, adult respiratory distress syndrome; FiO₂, fraction of inspiratory oxygen; PaCO₂, arterial carbon dioxide pressure; PaO₂, arterial oxygen pressure; PEEP, positive end-expiratory pressure; PIP, peak inspiratory pressure; P/L, protein-to-surfactant lipids; S-CK, surfactant CK; ^{99m}TcO₄⁻, technetium-99m pertechnetate

の関係を検討した。

対象および方法

I. サーファクタントの調整

実験には、金沢大学医学部麻酔・蘇生学教室で開発された補充療法用サーファクタント (surfactant CK, S-CK) を使用した。S-CK は、ブタの肺胞洗浄液から、遠心法、クロロホルム/メタノール (2/1, v/v) による抽出法、0.5% 食塩水による洗浄法、およびアセトン沈殿法を経て採取し、98% のリン脂質と1% の中性脂質および1% の疎水性タンパク質を成分としたものである²⁾。S-CK をラットに噴霧吸入させる際は、生理的食塩水に分散し、25mg/ml の濃度に調整したものをを用いた。

II. 動物実験 1

体重 340~450g の成熟ウイスター系ラット36匹を使用した。ペントバルビタール (大日本、大阪) 30mg/kg の腹腔内投与により麻酔した後、気管切開孔より内径 1.5mm の気管内チューブを挿入した。次いで図1に示すように、3匹のラットを一組にして、並列に人工呼吸回路に接続した。人工呼吸器 Servo 900B (Siemens-Elma, Solna, Sweden) は従圧式に設定し、最大吸気圧 (peak inspiratory pressure, PIP) を 25cmH₂O、終末呼気陽圧 (positive end-expiratory pressure, PEEP) を 7.5cmH₂O に定めた。なお、動物の肺コンプライアンスが変化しても PEEP の値が変動しないように、呼吸回路には容量 10l の気密のビン (airtight jar) を装着した。実験の全経過を通じ、換気

は純酸素を用い、呼吸回数を40回/分、呼気と吸気の時間比を 1:1 に固定した。

ラットの大腿動脈にカテーテルを挿入し、血圧測定と血液ガス測定のための採血にあてた。また、大腿静脈にもカテーテルを挿入し、乳酸加リンゲル液を 10ml/kg/h の速度で持続的に投与した。実験中は、ペントバルビタール 15mg/kg の腹腔内間歇投与と、臭化パンクロニウム (日本オルガノン、東京) 0.4mg/kg/h の持続的静注により、一定の麻酔深度と非動化を得た。

人工呼吸開始15分後に基準時の動脈血ガス分析を行った。ついで、PIP を 25cmH₂O に保ったまま PEEP を 0cmH₂O に低下させた後、すべてのラットに対して、大腸菌エンドトキシン 0111:B4 (Difco Laboratories, Detroit, U. S. A.) の生理食塩水分散液 (20mg/ml) を 2ml/kg あて、気管内チューブを介して肺内に注入した。エンドトキシン注入後は、30分毎に動脈血の酸素分圧 (arterial oxygen pressure, PaO₂) を測定した。なお、エンドトキシン注入後60分目の PaO₂ が 400mmHg 以上を示したラットに対しては、同量のエンドトキシンを再度注入した。

一組にしたラットの PaO₂ が 200mmHg 以下に低下した時点で、まず、2.5cmH₂O の PEEP を付加した。以後同様に PaO₂ が 200mmHg 以下に低下した時点で、2.5cmH₂O ずつ PEEP を増加させた。PEEP を 7.5cmH₂O に増加させても、ラットの PaO₂ が 200mmHg 以上に上昇しなくなった時点で、気管内吸引を行い、気道に出現した肺水腫液を可及的に除去

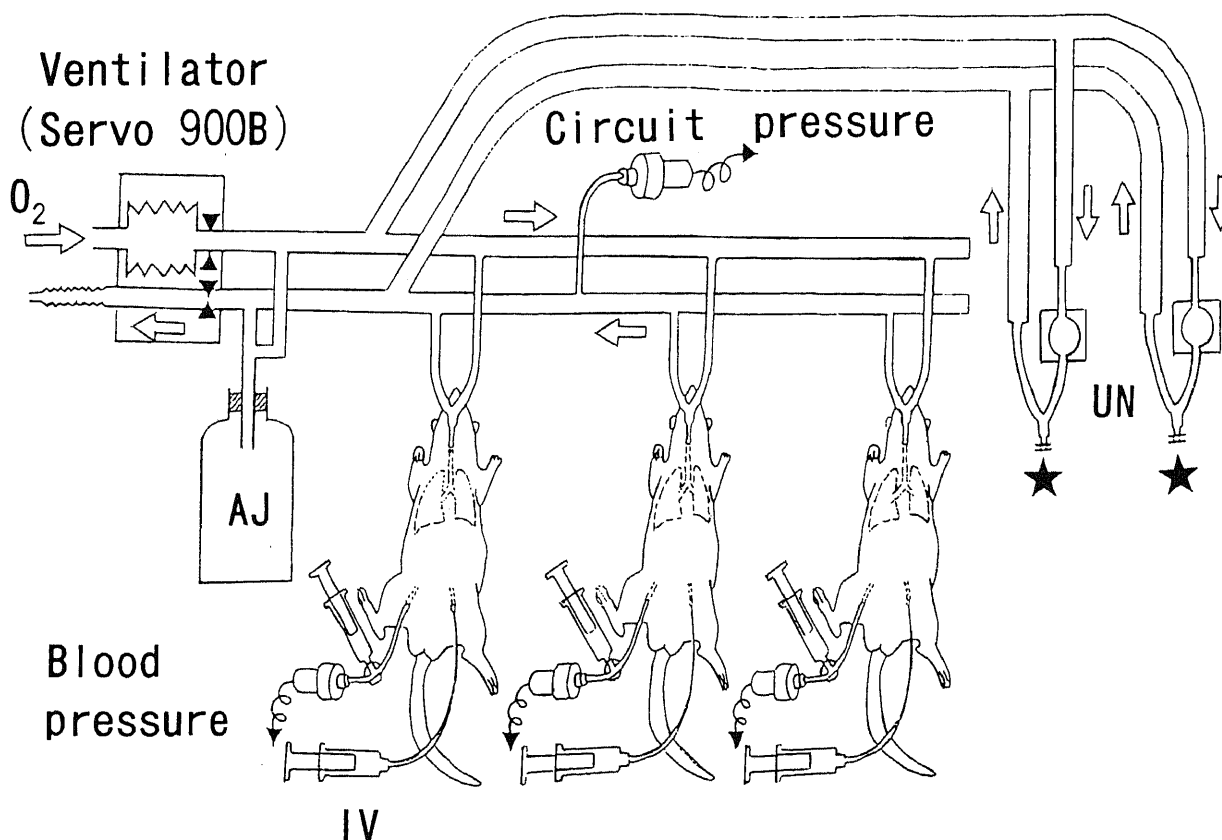


Fig. 1. Diagram of experimental setup. The nebulized group rats were connected to nebulization circuits (★) during the period of aerosol inhalation. Open arrows indicate direction of oxygen flow. AJ, airtight jar; IV, intravenous infusion; UN, ultrasonic nebulizer.

し、10分後に動脈血ガス分析を行った。以後、10分毎に気管内吸引と動脈血ガス分析を繰り返して行い、気管内吸引によっても PaO_2 が 200mmHg 以上を示さなくなった時点を群分け直前時とし、胸部レントゲン撮影を行った。肺水腫液は、量を測定した後、その後の分析に備えて冷凍保存した。また、この時点以降は、実験終了まで換気条件 ($\text{PIP}=25\text{cmH}_2\text{O}$, $\text{PEEP}=7.5\text{cmH}_2\text{O}$) を変更しなかった。

次いで一組にした3匹のラットのうち、1匹を対照群 (control group, C群) にその他の2匹を無作為に噴霧吸入30分群 (nebulized-for-30-min group, N-30 群)、噴霧吸入60分群 (N-60 群)、または噴霧吸入120分群 (N-120 群) に分けた。C群 ($n=12$) に対しては、そのまま人工呼吸と輸液のみを継続した。一方、N-30 群、N-60 群、および N-120 群 (各々、 $n=8$) に対しては、ダイアフラム型超音波ネブライザー装置 NE-U06 (オムロン、東京) を組み込んだ回路 (図1★) にラットを接続し、人工呼吸下にサーファクタントの噴霧吸入を各々30分、60分および120分間行った。まず、ネブライザー装置の薬剤槽に S-CK の分散液を 3ml 入れた。その後は15分毎に、分散液を 3ml ずつ新たに追加し、各々合計 6ml, 12ml および 24ml (S-CK にして 150mg, 300mg および 600mg) を30分、60分および120分かけて吸入させた。吸入終了後は、各々のラットを元の回路にもどした。なお、このネブライザーは直径 $3.4 \pm 1.2\mu\text{m}$ (平均値 \pm 標準偏差) のエアロゾルを発生した¹²⁾。また、吸入操作は呼吸回路内の圧に影響を与えなかった。

群分け後、15, 30, 60, 120, および180分目に動脈血ガス分析を行った。また、180分目に、C群と N-120 群では、胸部レントゲン撮影を行った。なお、 PaO_2 と動脈血炭酸ガス分圧 (arterial carbon dioxide pressure, PaCO_2) は、全自動血液ガス分析装置 ABL-3 (Radiometer, Copenhagen, Denmark) を用いて測定した。凍結保存した肺水腫液は、解凍した後、リン脂質濃度をリン脂質テストワコー (和光純薬、大阪) (過マンガン塩灰化法) で測定し、アルブミン濃度をアルブミンBテストワコー (和光純薬) (ブロムクレゾールグリーン法) で測定した。

実験終了後、致死量に近いペントバルビタールを静注したのち、気管内チューブを閉塞して吸収性無気肺を作成するとともに動物を屠殺した。開胸後、一組のラットを肺圧量曲線記録装置に並列に接続し、気道内圧を1分間毎に $5\text{cmH}_2\text{O}$ ずつ段階的に $30\text{cmH}_2\text{O}$ まで上昇させ、次いで同様に $0\text{cmH}_2\text{O}$ まで低下させて、それぞれの圧における肺気量を記録した²²⁾。肺圧量曲線の記録後、C群と N-120 群のラットについては、気道内圧を再び $30\text{cmH}_2\text{O}$ に高めて肺胞を開いたうえで、 $10\text{cmH}_2\text{O}$ に減圧して

保持し、肺動脈より 10% 中性ホルマリンを1時間還流して肺組織を固定した。肺を摘出した後、切片をヘマトキシリン・エオジンで染色し、組織学的観察を行った。

Ⅲ. 動物実験 2

体重 320~450g の成熟ウイスター系ラット 4 匹を使用し、サーファクタントの肺内到達量を検索した。実験 1 と同様に、ラットをペントバルビタールで麻酔した後、気管切開孔より挿管し、臭化パンクロニウムの投与により非動化を得た。次いで、超音波ネブライザー装置を組み込んだ回路にラットを接続し、従圧式人工呼吸 ($\text{PIP}=25\text{cmH}_2\text{O}$, $\text{PEEP}=7.5\text{cmH}_2\text{O}$) を行った。これらの動物に対しては、エンドトキシンを投与しなかったが、5~6mCi の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ テクネシウム・パーテクネタイト

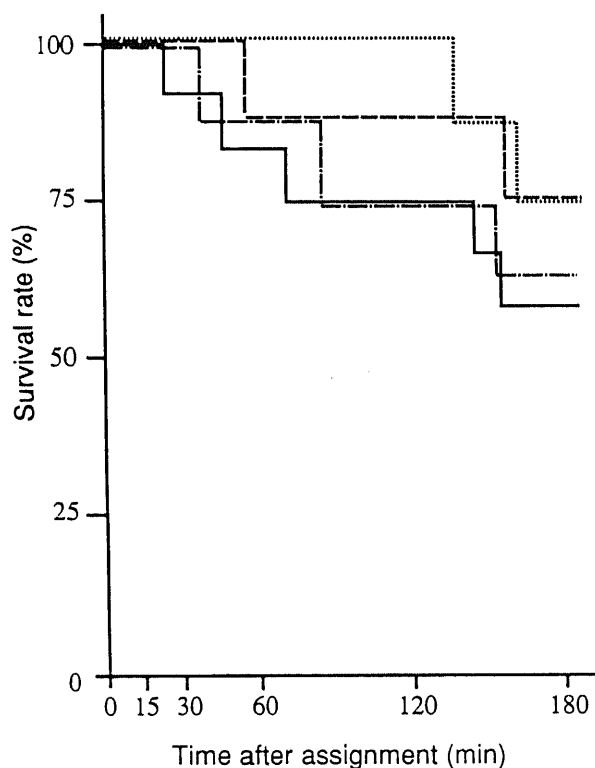


Fig. 2. Survival curves of the rats. Surfactant was given with ultrasonic nebulizer at zero time. —, control group; ---, N-30 group; - · - ·, N-60 group; · · · ·, N-120 group.

Table 1. Number, body weight, amount of injected endotoxin and survival rate of rats in experiment 1

Group	Number of rats used	Body weight ($\bar{x} \pm \text{SD}$, g)	Endotoxin injected ($\bar{x} \pm \text{SD}$, mg/kg)	Number (%) of survival rats
Control	12	375 ± 31	55 ± 20	7 (58.3)
N-30	8	383 ± 32	60 ± 30	5 (62.5)
N-60	8	378 ± 27	55 ± 20	6 (75.0)
N-120	8	363 ± 17	55 ± 20	6 (75.0)

N-30, nebulized-for-30-min; N-60, nebulized-for-60-min; N-120, nebulized-for-120-min.

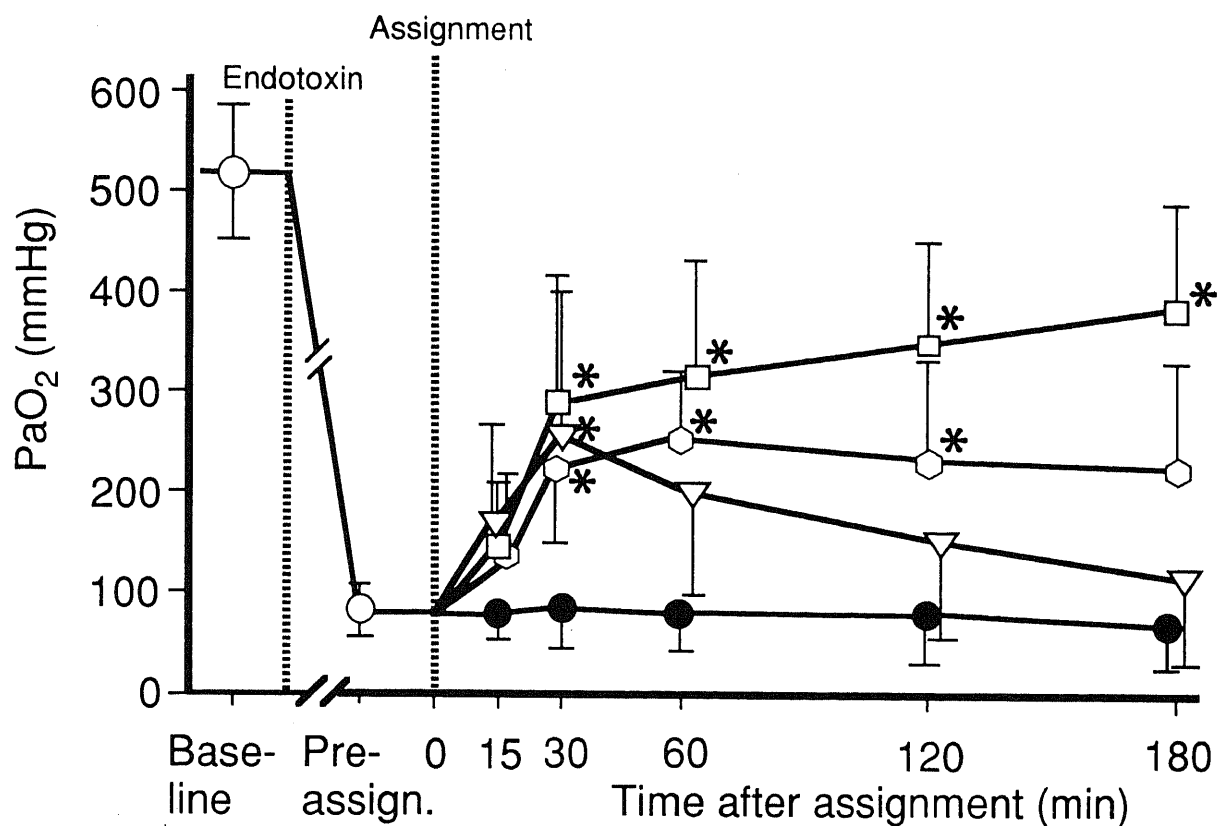


Fig. 3. Changes of PaO₂ in experiment 1. Values are $\bar{x} \pm SD$. Pre-assign., pre-assignment. *P<0.05 vs. control group. ○, all animals; ●, control group; ▽, N-30 group; ◇, N-60 group; □, N-120 group.

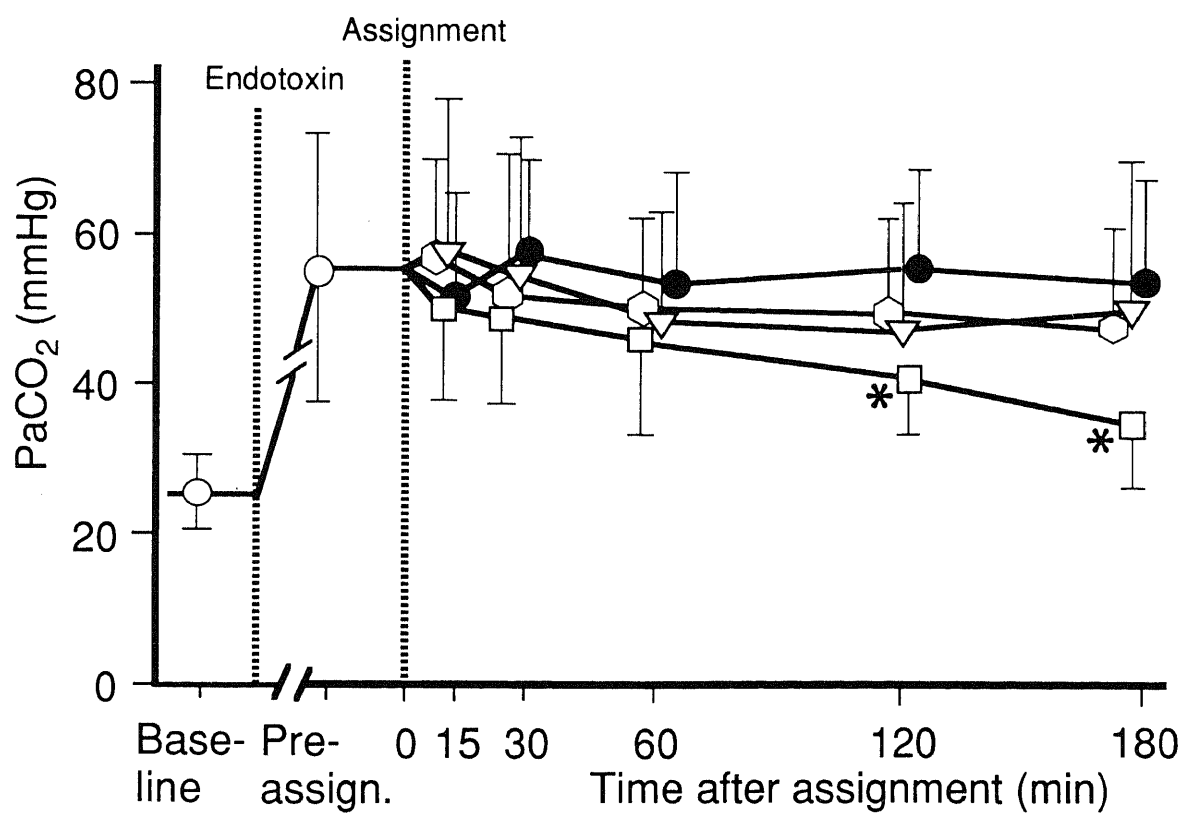


Fig. 4. Changes of PaCO₂ in experiment 1. Values are $\bar{x} \pm SD$. Pre-assign., pre-assignment. *P<0.05 vs. control group. ○, all animals; ●, control group; ▽, N-30 group; ◇, N-60 group; □, N-120 group.

(technetium-99m pertechnetate, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, 第1ラジオアイソトープ研究所, 東京) を添加した S-CK の分散液 (25mg/ml) 12ml を, 実験1と同様の方法で, 60分間かけて噴霧吸入させた. ガンマー・カメラ GCA401 (東芝, 東京) を用い, S-CK に添加した全放射線量を実験前に測定しておき, 吸入終了後にラットの全身, 呼吸回路内およびネブライザーの薬剤槽内の放射線量を別々に測定した. なお, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ は肺に到達した後, 速やかに全身循環に取り込まれるので²³⁾, ラットの全身の放射線量から肺内到達量を算出した. また, その算出にあたっては, 半減期およびバックグラウンドの放射線量を補正した.

IV. 統計処理

測定結果は, 平均値±標準偏差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) で表わした. 生存率は, Fisher の直接確率計算法で評価した. その他の数値の群間の差の検定には, 二元配置分散分析 (ANOVA) を行ったうえで, Tukey-Kramer の方法を用いた. 危険率 (P) が0.05以下をもって有意差と判定した.

成績

I. 動物実験 1

表1に示すように, エンドトキシンの注入量は平均55~60mg/kg で, 全群間に有意差を認めなかった. 最初のエンドトキシン注入から群分けまでの時間は184±81分で, 全群間に有意差を認めなかった. 群分け前に採取された肺水腫液の総量は4.8±2.3ml/kg (全ラット, n=36) で, そのアルブミン濃度

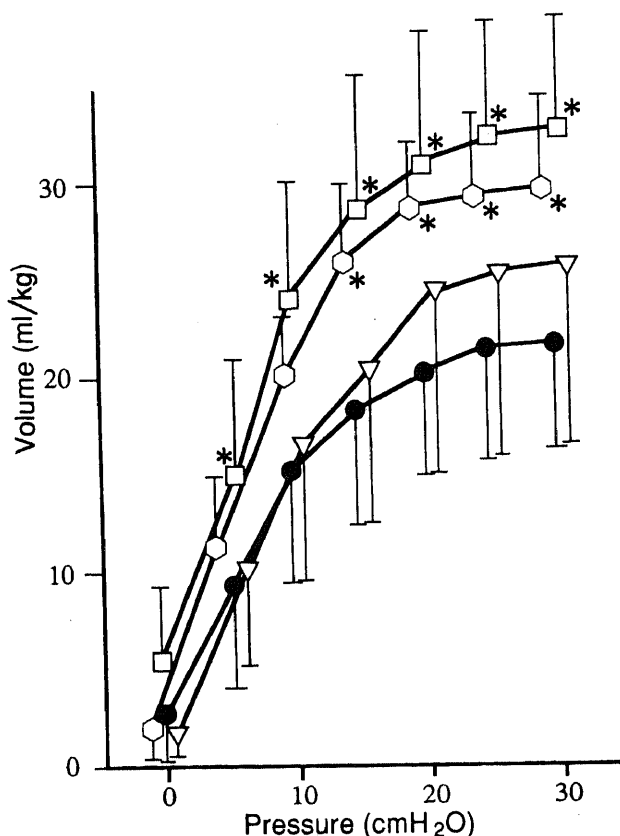


Fig. 5. Deflation limbs of static pressure-volume recordings of the lungs. Values are $\bar{x} \pm \text{SD}$. *P<0.05 vs. control group. ●, control group; ▽, N-30 group; ○, N-60 group; □, N-120 group.

は23±11mg/ml, リン脂質濃度は1.5±0.6mg/mlであった. 図2に示すように, 群分け後180分目の時点で, C群のラットは12匹中7匹が, N-30群のラットは8匹中5匹が, N-60群およびN-120群のラットは8匹中6匹が生存していた. しかし, 生存率には4群間で有意差を認めなかった.

基準時の PaO_2 は519±66mmHg (全ラット, n=36) であったが, エンドトキシン注入後に82±22mmHgに低下した. なお, これらの値には, 4群間で有意差を認めなかった. 図3に示すように, C群の PaO_2 の平均値は, 群分け後180分間, 80mmHg 以下の低値のままで推移した. 一方, N-30群, N-60群およびN-120群の PaO_2 は, 群分け後30分目には, 260±153mmHg, 212±72mmHg および 283±122mmHg に上昇した (C群に対しそれぞれ $P<0.05$). しかし, N-30群の PaO_2 は, 吸入終了後から緩やかに低下し, 吸入終了30分後 (群分け後60分目) にはC群に対し有意差を示さなくなった. N-60群およびN-120群の PaO_2 は, 群分け後60分目には, 249±70mmHg および 318±105mmHg とさらに上昇した (C群に対しそれぞれ $P<0.05$). しかし, N-60群の PaO_2 は, 吸入終了後から緩やかに低下し, 群分け後180分目には, C群に対し有意差を示さなくなった. N-120群の PaO_2 は, 群分け後120分目には 346±94mmHg, 180分目には 391±94mmHg の値を維持した (C群に対し $P<0.05$).

基準時の PaCO_2 は26±5mmHg (全ラット, n=36) であったが, エンドトキシン注入後の群分け直前時には55±18mmHgに上昇した. なお, これらの値には, 4群間で有意差を認めなかった. 図4に示すように, C群の PaCO_2 の平均値は, 群分け後180分間, 55mmHg 前後の高値で推移した. N-30群およびN-60群の PaCO_2 は, 実験終了時まで50mmHg 前後で推移し, C群に対し有意差を示さなかった. 一方, N-120群の PaCO_2 は, 群分け後120分目に40±7mmHg, 180分目に34±8mmHgへと低下した (C群に対し $P<0.05$).

図5に減圧時肺圧量曲線を示す. N-30群の肺気量は, すべての圧で, C群との間に有意差が認められなかった. 一方, N-60群の肺気量は30cmH₂O (最大加圧) から15cmH₂O までの

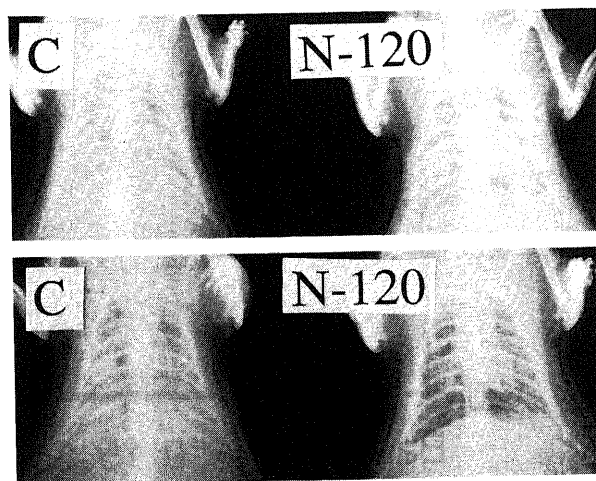


Fig. 6. Chest roentgenograms taken in a set. C, control rat; N-120, N-120 group rat. Upper panel was taken at the pre-assignment period and lower one at 180 mins after the assignment.

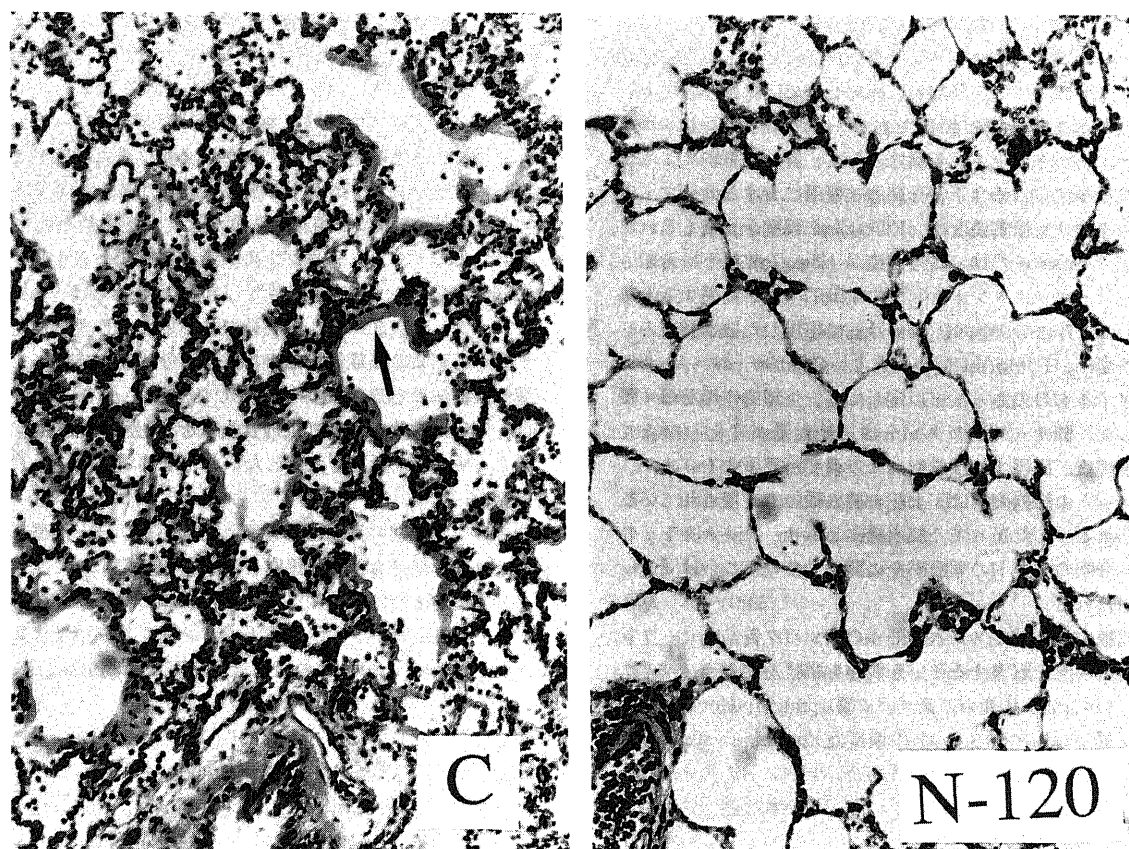


Fig. 7. Stained sections of the lungs of rats given endotoxin in the trachea. Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$. C, control rat; N-120, N-120 group rat. Arrow indicates hyaline membrane.

圧で、また N-120 群の肺気量は $30\text{cmH}_2\text{O}$ (最大加圧) から $5\text{cmH}_2\text{O}$ までの圧で、C 群に比べ有意に大きい値を示した。

図 6 に C 群と N-120 群で撮影した胸部レントゲン写真の一例を示す。エンドトキシン注入後、レントゲン撮影を行った総てのラットの肺野に、無気肺あるいは肺水腫を示唆する暗陰影を認めた (上段)。群分け後 180 分目、C 群では改善を認めなかったが、N-120 群では肺野の透光性が改善した (下段)。

図 7 に C 群と N-120 群の肺組織所見を示す。C 群では、肺胞腔が小さく、肺胞腔内に好中球を多数認め、硝子膜 (矢印) の出現が認められた。一方、N-120 群では肺胞腔が大きく、肺胞腔内への好中球の浸潤や硝子膜形成は C 群よりも少なかった。

II. 動物実験 2

60 分間の噴霧吸入後、ラットの全身の放射線量は、使用した全量の $2.3 \pm 1.0\%$ (最大量 3.3%) であった。使用した全放射線量の $51.2 \pm 15.1\%$ が薬剤槽内に残存しており、 $33.8 \pm 12.0\%$ が呼吸回路内から検出された。また、 $12.7 \pm 3.4\%$ は検出されず、大気中に放出されたものと考えられた。

考 察

今回の実験で、ラットの肺内へエンドトキシンを経気道的に注入した結果、PEEP を付加した人工呼吸でも改善不可能な低酸素血症が出現し、胸部レントゲン写真では肺野にびまん性陰影を認めるようになった。また、 4.8ml/kg 前後の肺水腫液が気道内に出現し、実験終了時の C 群の肺圧量曲線から肺コンプ

リアンスの低下が示唆された。しかし、噴霧吸入療法により、上記の所見は有意に改善し、特に N-120 群でその効果が大きかった。

エンドトキシンを経気道的に注入した際における肺の変化は、ARDS の所見にはほぼ一致している。すなわち、ARDS の診断基準は、1) 吸気中の酸素濃度 (fraction of inspiratory oxygen, FiO_2) を高めても改善しない低酸素血症 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200\text{mmHg}$)、2) 胸部レントゲン写真でびまん性浸潤影を認めること、3) 肺水腫を認めること、および 4) 肺コンプライアンスが低下していることと規定されており²⁰、今回のラットはこれらの項目を総て満たしている。

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁の構成成分であり、白血球、補体系および凝固系を活性化作用がある。活性化された好中球から放出される活性酸素、タンパク質分解酵素、サイトカインおよびアラキドン酸分解産物などは、肺胞上皮や血管内皮細胞の透過性を亢進させると考えられている^{25)~28)}。その結果、エンドトキシン血症が原因でおきる ARDS では、タンパク質に富む肺水腫液が出現することになる。

肺水腫液が出現した際の呼吸不全の原因としては、まず第一に、肺胞腔の減少と気道閉塞が考えられる。しかし、今回の実験では、群分け前に気管内吸引を行っても PaO_2 が改善しなかったことから、肺胞腔の減少と気道閉塞だけが呼吸不全の原因とは考え難い。近年、肺水腫液が出現した場合の呼吸不全の発生機序として、サーファクタントの不活化という問題が注目

されている¹⁷⁻²¹⁾。

肺サーファクタントは、リン脂質を主成分とし、肺胞被覆層の表面張力を低下させて肺胞の収縮力を弱め、肺胞の虚脱と肺水腫液の漏出を防止する物質である²²⁾。肺水腫液によりサーファクタントが不活化される機序として、第一に希釈による作用の消失が挙げられる。正常な肺胞被覆層におけるサーファクタント由来のリン脂質濃度は、120mg/ml 程度と見積もられている³⁰⁾。Kobayashi ら³¹⁾は、この濃度が 1.5mg/ml 以下に希釈されると、サーファクタントとしての生理的作用が消失すると報告している。今回の実験で、群分け前に出現した肺水腫液のリン脂質濃度は、1.5mg/ml 前後であり、全てがサーファクタントに由来するものであったと仮定しても、生理的作用を示す限界であった。肺サーファクタントは、絶対量に変化しなくても、肺水腫液が出現すれば希釈により濃度が低下する。また、今回のラットの肺胞表面は、上記の肺水腫液で被覆されていると考えられる。したがって、肺水腫によるサーファクタントの希釈が、今回のラットの呼吸不全に関与していたことは間違いないと思われる。

さらに第二点として、肺水腫液中のタンパク質が、サーファクタントの活性を阻害するという問題を挙げる必要がある^{32,33)}。Nitta ら³⁴⁾は、肺水腫液中のタンパク質 (protein) とサーファクタント脂質 (surfactant lipids) の濃度比 (protein-to-surfactant lipids ratio, P/L 比) が 5.6 以上の場合、サーファクタントはその生理活性を失うと報告している。今回の肺水腫液のアルブミン濃度が 23mg/ml 前後であったことから、その P/L 比は少なくとも 15 (23/1.5) 以上である。したがって、肺水腫液中のタンパク質によるサーファクタントの活性阻害も、呼吸不全を生じた一因と考えられる。

サーファクタントが不活化された状態を放置すれば、肺血管系からタンパク質を含んだ肺水腫液がさらに漏出し、呼吸機能が一段と低下する悪循環に陥ることになり³⁵⁾、肺組織の広範な破壊につながる³⁶⁾。肺水腫液によりサーファクタントが不活化された場合、PIP を高めたり PEEP を付加した人工呼吸を行い、肺胞の虚脱を防ぐ対処法が考えられる。しかし、今回の実験では、PIP を 25cmH₂O、PEEP を 7.5cmH₂O に設定したが、C 群の PaO₂/FiO₂ は 80mmHg 以下にとどまった。この結果は、肺水腫液が多量に出現し、サーファクタントの希釈や不活化により呼吸不全に陥った患者に対して、人工呼吸法のみで対処するには限界があることを示していると思われる。

呼吸不全がサーファクタントの希釈や不活化に基づくものならば、サーファクタントを補充するのが最も手取り早い治療法であると考えられる。近年、Eijking ら³⁷⁾は、塩酸を気管内に注入して呼吸不全になったラットに対し、その直後にサーファクタントを補充すると有効であったが、60分以後、すなわち多量の肺水腫液が出現してから補充療法を行っても効果が不十分であったと報告している。この実験結果は、多量の肺水腫液が蓄積する以前、すなわち呼吸不全がまだ進行していない早期から、サーファクタント補充療法を開始した方が有効なことを示している。

現在、サーファクタントの投与方法として、直接注入法が用いられている。しかし、直接注入法によりサーファクタントの十分量を肺全体に均一に分布させるためには、比較的大量の分散液 (2-6ml/kg) を一度に注入する必要がある¹²⁾。その際、液体を注入したことによる血液ガスの一過性の悪化や徐脈の発

生、さらには気道内圧を高めた換気が必要なために肺を損傷させるなどの危険がある^{18,19)}。これらの理由から、呼吸不全がまだ顕著でない早期の ARDS 患者に対し、直接注入法は用い難い。

一方、噴霧吸入療法は、肺内の液体貯留が緩徐なため、安全性が高く、また経過を観察しながら必要な量だけ補充できる。さらに、サーファクタントの肺内の分布が均一であるという利点がある²⁰⁾。実際に、噴霧吸入療法は、肺洗浄動物および未熟動物などのサーファクタントの欠乏が原因でおきる呼吸不全を改善すると報告されている^{12,20)}。しかし、これらは、単純なサーファクタント欠如モデルの実験である。今回の実験は、エンドトキシンにより炎症性機転が加味した呼吸不全に対しても、噴霧吸入療法の有効なことを証明したと云う。なお、著者は、同様の動物に対して生理食塩水を120分間噴霧吸入させた場合、呼吸不全が全く改善しないことを確認している (山田ら、未発表)。

さらに、今回の実験では、吸入時間が長いほど治療効果が大きいという結果を得た。正常ラットに対し ^{99m}TcO₄⁻ を吸入させた動物実験 2 では、使用した全放射線量のうち、最大で 3.3% が肺に到達した。S-CK が ^{99m}TcO₄⁻ と同じ比率で肺に到達したと仮定すれば、30分間の吸入でおおよそ 13.5mg/kg (150mg × 0.033/体重)、60分間で 27mg/kg、120分間で 54mg/kg が肺に到達したと計算される。早稲田ら³⁸⁾は、肺洗浄ラットに対し直接注入法によるサーファクタント補充を行った際、投与量が 15mg/kg では効果が一過性であったのに対し、45mg/kg 以上の場合には効果が持続したと報告している。このことから、噴霧吸入療法でも、120分間施行すると十分量の (54mg/kg) の S-CK が肺内に到達し、呼吸不全を持続的に改善する効果が得られたものと思われる。一方、N-30 群および N-60 群では、S-CK の肺内到達量が少ないため効果が不十分であったと思われる。

噴霧吸入療法は、安全性の面で直接注入法より勝れているが、問題点も存在する。とくに、多量のサーファクタントが呼吸と共に放出されて非効率的であることが指摘される。本実験で用いたネブライザーの発生するエアロゾルの直径は、3.4μm 内外で肺胞内に到達しやすい大きさであった¹²⁾。しかし、正常ラットを用いた実験 2 では、使用したサーファクタントが、最大でも 3.3% しか肺胞に到達しないという所見を得た。肺に障害があり一回換気量が減少した場合、さらに肺胞到達量が減少することも考えられる。今後、肺内に到達するサーファクタントの量を増加させ、より良好な治療効果を得るためには、さらに噴霧吸入の時間を延長するか、あるいは効率のよい吸入法を開発することが必要であろう。なお、超音波に曝露することによりサーファクタントの活性が低下する可能性も考えられる。しかし、超音波曝露時間が45分以内の場合、S-CK の活性低下は少ないと報告されている¹⁸⁾。したがって本実験で用いたように、15分おきに新しいサーファクタントを薬剤槽に追加すれば、この問題は解決できよう。

今回の実験では、N-120 群でも 8 匹中 2 匹が観察期間中に死亡し、C 群との間に生存率の有意差を見出すことが出来なかった。エンドトキシンは、気管内に注入された場合でもショックおよび多臓器不全を引き起こす。事実、N-120 群の 2 匹も、噴霧吸入療法により血液ガス所見は好転したものの、エンドトキシン注入直後から血圧が低下し、群わけ後 140 分目と 160 分目に死亡した。今回の実験では、肺機能の変化を中心に

検索する目的で、循環不全および多臓器不全に対する処置は輸液以外に一切行わず、また各群の処置も噴霧吸入以外は同一にした。呼吸不全は生命を左右する最も重要な因子である。しかし、循環不全に対する処置を十分に行ったうえで、もう少し長時間観察すれば、生存率に対するサーファクタント吸入療法の効果も見い出せたのではないかと考える。

今回の実験で、噴霧吸入療法は、エンドトキシンの気道内注入により出現した呼吸不全を有意に改善すること、および吸入時間が長い程改善効果の大きいことが示された。噴霧吸入療法は、安全性が高く、経過を観察しながら必要な量だけサーファクタントを補充できるという利点がある。現時点ではまだ動物実験段階であるが、本法を早期の ARDS 患者に用いれば治療効果が得られると考えられるので、臨床応用に向けた研究が発展することを期待したい。

結 論

ラットの肺内へエンドトキシンを経気道的に注入して呼吸不全を発症させたうえで、サーファクタント噴霧吸入療法を行い、吸入時間と治療効果の関係を検討し、以下の結論を得た。

1. $56 \pm 24 \text{ mg/kg}$ (平均値 \pm 標準偏差) のエンドトキシンを経気道的に注入すると、低酸素血症や肺水腫液を伴った急性呼吸不全が生じる。この呼吸不全は、ARDS に類似しており、PEEP を付加した人工呼吸のみでは症状を改善させることが困難であった。

2. エンドトキシンの経気道的注入後に発症する急性呼吸不全の機序には、肺水腫液によるサーファクタントの希釈と不活性化が関与していると考えられる。

3. エンドトキシンの経気道的注入後に発症する急性呼吸不全に対して、サーファクタント噴霧吸入療法を行うと、血液ガス所見、胸部レントゲン所見および肺組織所見が改善した。特に、噴霧吸入を120分間行った群では、30分および60分間しか行なわなかった群に比べ改善効果が大きかった。これは、噴霧吸入療法を120分間行くと、呼吸不全を改善するのに十分なサーファクタントが肺内に到達するためと考えられた。

4. 超音波ネブライザーを用いて、サーファクタントを吸入させた場合、肺内に到達するサーファクタントの量は、最大でも使用した全量の 3.3% であり、到達量を増加させる工夫が必要であると結論された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導と御校閲をいただいた小林 勉教授に深く感謝いたします。また、実験に御協力いただいた麻酔・蘇生学教室の田代勝己助手、李 文志博士、教室員一同ならびに実験助手の方々に深く感謝いたします。また、 $^{99}\text{TcO}_4^-$ を供与してくださった金沢大学医学部附属病院医療情報部、分校久志助教授に感謝いたします。なお、本研究は、文部省科学研究費 (課題番号02543352および05671254) と浅野研究基金の援助を受けたことを付記し、謝意を表します。

本論文の要旨は第41回日本麻酔学会 (1994, 東京) および The 9th Asian Australasian Congress of Anaesthesiologists (1994, Bangkok, Thailand) において発表した。

文 献

1) Holm, B. A. & Matalon, S.: Role of pulmonary surfactant in the development and treatment of adult respiratory distress syndrome. *Anesth. Analg.*, **69**, 805-818 (1989).

2) 小林 勉, 田代勝己, 李 文志: 肺サーファクタント: その異常が関与する病態. *人工呼吸*, **9**, 95-100 (1992).

3) Lewis, J. F. & Jobe, A. H.: Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**, 218-233 (1993).

4) Petty, T. L., Silvers, G. W., Paul, G. W. & Stanford, R. E.: Abnormalities in the lung elastic properties and surfactant function in adult respiratory distress syndrome. *Chest*, **75**, 571-574 (1979).

5) Pison, U., Seeger, W., Buchhorn, R., Joka, T., Brand, M., Obertacke, U., Neuhof, H. & Schmitz-Neuerburg, K.-P.: Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **140**, 1033-1039 (1989).

6) Holm, B. A., Notter, R. H., Siegle, J. & Matalon, S.: Pulmonary physiological and surfactant changes during injury and recovery from hypoxia. *J. Appl. Physiol.*, **59**, 1402-1409 (1985).

7) Gregory, T. J., Longmore, W. J., Moxley, M. A., Whitsett, J. A., Reed, C. R., Fowler, A. A., Hudson, L. D., Maunder, R. J., Crim, C. & Hyers, T. M.: Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.*, **88**, 1976-1981 (1991).

8) Hallman, M., Spragg, R., Harrell, J. H., Moser, K. M. & Gluck, L.: Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J. Clin. Invest.*, **70**, 673-683 (1982).

9) Lewis, J. F., Ikegami, M. & Jobe, A. H.: Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J. Appl. Physiol.*, **69**, 2303-2310 (1990).

10) 田代勝己, 李 文志, 新多恵子, 紫藤明美, 小林 勉: エンドトキンにより呼吸不全を呈したラットに対する肺サーファクタント補充療法の効果. *日界面医誌*, **24**, 106-112 (1993).

11) 李 文志: 塩素ガスを吸入させたラットの急性呼吸不全に対するサーファクタント補充療法. *十全医会誌*, **102**, 597-604 (1993).

12) Li, W.-Z., Chen, W.-M. & Kobayashi, T.: Aerosolised surfactant reverses respiratory failure in lung-lavaged rats. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, **38**, 82-88 (1994).

13) Nosaka, S., Sakai, T., Yonekura, M. & Yoshikawa, K.: Surfactant for adults with respiratory failure. *Lancet*, **336**, 947-948 (1990).

14) 上田真太郎, 河村宏一, 大嶋 康, 蜂須賀久善, 遠藤ますみ, 斉藤 潤, 菊池久隆, 細川芳文, 岡安大仁, 桜井 勇, 菅根美夫: 肺炎後低酸素血症持続例 (成人) への人工・肺表面活性物質 (Surfactant-TA) の臨床応用. *日界面医誌*, **19**, 60-77 (1989).

15) Weg, J., Reines, H., Balk, R., Tharratt, R., Kearney, P., Killian, T., Scholten, D., Zaccardelli, D., Horton, J., Pattishall, E. & the EXOSURF-ARDS Sepsis Study Group.: Safety and efficacy of an aerosolized surfactant (Exosurf®) in human sepsis induced ARDS. *Chest*, **100**, 137s (1991).

- 16) Weidemann, H., Baughman, R., deBoisblanc, B., Schuster, D., Caldwell, E., Weg, J., Balk, R., Jenkinson, S., Wiegelt, J., Tharratt, R., Horton, J., Pattishall, E., Long, W. & the EXOSURF ARDS Sepsis Study Group.: A multicenter trial in human sepsis induced ARDS of an aerosolized synthetic surfactant (Exosurf). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145, A184 (1992).
- 17) Richman, P. S., Spragg, R. G., Robertson, B., Merritt, T. A. & Curstedt, T.: The adult respiratory distress syndrome: first trials with surfactant replacement. *Eur. Respir. J.*, 2, (Suppl. 3), 109s-111s (1989).
- 18) 陳 衛民, 小林 勉, 李 文志, 谷口淳朗, 高橋麗子, 示野勝巳, 村上誠一: サーファクタント補充療法における副作用の検討: 正常ラットに対する気管内直接注入法と噴霧吸入法の比較. *北陸麻酔誌*, 26, 21-28 (1992).
- 19) Jobe, A. H.: Pulmonary surfactant therapy. *N. Eng. J. Med.*, 328, 861-868 (1993).
- 20) Lewis, J., Ikegami, M., Jobe, A. H. & Tabor, B.: Aerosolized surfactant treatment of premature lambs. *J. Appl. Physiol.*, 70, 869-876 (1991).
- 21) 高田善則, 小林 勉, 片岡久範, 村上誠一, 小久保雅之: 肺サーファクタント由来物質の表面活性に対する温度と湿度の影響. *日界面医誌*, 13, 128-134 (1982).
- 22) Enhörning, G. & Robertson, B.: Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics*, 50, 58-66 (1972).
- 23) 南 真司, 岡藤和博, 佐賀 務, 藤村政樹, 金森一紀, 宮保 進, 服部旬一, 川井 清: モルモットにおける定量的吸入負荷装置の開発: その基礎的検討. *日胸疾会誌*, 21, 252-258 (1983).
- 24) Murray, J. F., Matthay, M. A., Luce, J. M. & Flick, M. R.: An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 138, 720-723 (1988).
- 25) Neuhof, H.: Action and interactions of mediator system and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 35, (Suppl 95), 7-14 (1991).
- 26) Demling, R. H.: The role of mediators in human ARDS. *J. Crit. Care*, 3, 56 (1988).
- 27) Tate, R. M. & Repine, J. E.: Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 128, 552 (1983).
- 28) Rinaldo, J. E. & Rogers, R. M.: Adult respiratory distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair. *N. Engl. J. Med.*, 306, 900-909 (1982).
- 29) Haagsman, H. P. & van Golde, L. M. G.: Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu. Rev. Physiol.*, 53, 441-464 (1991).
- 30) Kobayashi, T. & Robertson, B.: Surface adsorption of pulmonary surfactant in relation to bulkphase concentration and presence of CaCl_2 . *Respiration*, 44, 63-70 (1983).
- 31) Kobayashi, T., Shido, A., Nitta, K., Inui, S., Ganzuka, M. & Robertson, B.: The critical concentration of surfactant in fetal lung liquid at birth. *Respir. Physiol.*, 80, 181-192 (1990).
- 32) Seeger, W., Stohr, G., Wolf, H. R. D. & Neuhof, H.: Alterations of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J. Appl. Physiol.*, 58, 326-328 (1985).
- 33) Fuchimukai, T., Fujiwara, T., Takahashi, A. & Enhörning, G.: Artificial pulmonary surfactant inhibited by protein. *J. Appl. Physiol.*, 62, 429-437 (1987).
- 34) Nitta, K. & Kobayashi, T.: Impairment of surfactant activity and ventilation by proteins in lung edema fluid. *Respir. Physiol.*, 95, 43-51 (1994).
- 35) Jobe, A., Ikegami, M., Jacobs, H., Jones, S. & Conaway, D.: Permeability of premature lamb lungs to protein and the effect of surfactant on that permeability. *J. Appl. Physiol.*, 55, 169-176 (1983).
- 36) Lachmann, B., Robertson, B. & Vogel, J.: In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 24, 231-236 (1980).
- 37) Eijking, E. P., Gommers, D., So, K. L., deMaat, M. P. M., Mouton, J. W. & Lachmann, B.: Prevention of respiratory failure after hydrochloric acid aspiration by intratracheal surfactant instillation in rats. *Anesth. Analg.*, 76, 472-477 (1993).
- 38) 早稻田祐子, 田代勝己, 李 文志, 山田圭輔, 小林勉: 終末呼気陽圧とサーファクタント投与量が肺洗浄ラットに与える効果. *日界面医誌*, 25, 83-88 (1994).

Effects of Inhalation of Aerosolized Surfactant on Respiratory Failure Induced by Intratracheal Endotoxin in Rats Keisuke Yamada, Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **104**, 26—35 (1995)

Key words adult respiratory distress syndrome, aerosolized surfactant, endotoxin, lung edema, ultrasonic nebulizer

Abstract

The effects of inhalation of aerosolized surfactant with various durations on respiratory failure induced by intratracheal endotoxin were studied in 36 adult rats weighing 340-450 g. Each rat was anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital and intubated through a tracheotomy. They were mechanically ventilated with 100% oxygen with a peak inspiratory pressure of 25 cmH₂O, and a positive end-expiratory pressure of 7.5 cmH₂O. Then 56 ± 24 mg/kg ($\bar{x} \pm SD$) of endotoxin was injected into the trachea. About 180 min after the injection, the animals developed severe respiratory failure similar to adult respiratory distress syndrome (ARDS): the arterial blood oxygen pressure (PaO₂) values decreased from 519 ± 66 mmHg to 82 ± 22 mmHg, a diffuse shadow appeared in the chest roentgenogram, 4.8 ± 2.3 ml/kg of lung edema fluid appeared in the airway and lung compliance decreased. Then the animals were randomly divided into 4 groups. No treatment was performed in the control group (n=12), and the mean PaO₂ values of this group remained below 80 mmHg throughout the experiment (180 min after separation). A modified natural porcine surfactant was given with ultrasonic nebulizer for 30 min in N-30 group (n=8), for 60 min in N-60 group (n=8) and for 120 min in N-120 (n=8). Thirty minutes after separation, the PaO₂ of the N-30, N-60 and N-120 groups increased to 252 ± 120 mmHg ($P < 0.05$ vs. control group). The PaO₂ of the N-30 and N-60 groups gradually decreased after the end of inhalation, and the values at 180 min after separation were not significantly better than that of the control group. On the other hand, the value of the N-120 group increased to 346 ± 94 mmHg at 120 min after separation, and furthermore to 391 ± 94 mmHg at 180 min after separation ($P < 0.05$ vs. control group). In the N-120 group, the diffuse shadow of the chest roentgenogram almost disappeared. In the N-60 and N-120 groups, the pressure-volume relationship of the lung was also significantly better than that of the control group ($P < 0.05$). Histological examination of the lung revealed that alveoli were larger and more aerated with less leukocytes in the N-120 group than in the control group. By an additional experiment with the surfactant and technetium-99m pertechnetate, the dose of aerosolized surfactant delivered to the lung was estimated to reach up to 54 mg/kg in the N-120 group. From these results, it was concluded that inhalation of aerosolized surfactant for 120 min clearly reduced the ARDS-like respiratory failure induced by intratracheal endotoxin. But inhalation for less than 60 min could not deliver sufficient surfactant to reduce respiratory failure.